

전골수구백혈병 세포주 HL-60에 대한 Eugenol의 세포자멸사(Apoptosis) 유도 효과

가톨릭대학교 의과대학 성가병원 혈액내과¹, 경희대학교 약학대학²

길옥현¹ · 이기현¹ · 이경태² · 진종률¹

Eugenol Induces a Reactive Oxygen Species-mediated Apoptosis in HL-60 Human Promyelocytic Leukemia Cells

Uk-Hyun Kil, M.D.¹, Kee Hyun Lee, M.D.¹, Kyung-Tae Lee, Ph.D.² and Jong-Youl Jin, M.D.¹

¹Department of Internal Medicine, Holy Family Hospital, College of Medicine,
The Catholic University of Korea, Bucheon, ²College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Background: Eugenol is a major component of the essential oil isolated from *Eugenia caryophyllata* (Myrtaceae), and has been widely used as a traditional medicine. In this study, the effects of eugenol on the cytotoxicity, induction of apoptosis and putative pathways of its actions were investigated in human promyelocytic leukemia cells (HL-60).

Methods: After applying eugenol to cultured HL-60, the changes in the mitochondrial membrane potential of the cells were monitored after double staining with propidium iodide and rhodamine 123, with 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate was used to measure of levels of reactive oxygen species (ROS)

Results: Eugenol was shown to be a potent inducer of apoptosis; transducing the apoptotic signal via ROS generation; thereby, inducing mitochondrial permeability transition (MPT) and cytochrome *c* release to the cytosol. The production of ROS, mitochondrial alteration and subsequent apoptotic cell death in eugenol-treated cells were blocked by the antioxidant, *N*-acetylcysteine (NAC).

Conclusion: Taken together, the present study has demonstrated that eugenol induces ROS-mediated mitochondrial permeability transition and resultant cytochrome *c* release. (*Korean J Hematol* 2005;40: 65-74.)

Key Words: Eugenol, HL-60 cells, Apoptosis, Reactive oxygen species, Cytochrome *c*

접수 : 2005년 4월 28일, 수정 : 2005년 5월 20일

승인 : 2005년 6월 24일

교신저자 : 진종률, 경기도 부천시 원미구 소사동 2번지

☎ 420-717, 가톨릭의대 성가병원 내과

Tel: 032-340-2114, Fax: 032-340-2667

E-mail: blood@medimail.co.kr

본 내용은 대한혈액학회 제46차 춘계학술대회에 발표한 내용임.

Correspondence to : Jong-Youl Jin, M.D.

Department of Internal Medicine, Holy Family Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea

2 Sosa-dong, Wonmi-gu, Bucheon 420-717, Korea

Tel: +82-32-340-2114, Fax: +82-32-340-2667

E-mail: blood@medimail.co.kr

서론

Eugenol은 소화불량, 급만성 위염, 설사를 치료하기 위하여 민간요법으로 쓰여지고 있는 정향나무(cloves), 월계수(bay leaves), 계피(cinnamon) 등의 싹에서 분리한 물질로 치과용 국소 마취제 혹은 진통제로 쓰여지고 있다.¹⁾ 또한 이 정유는 항진균, 항경련, 종양의 발생 억제, 돌연변이 유발 억제 효과를 가지고 있다는 보고가 있다.¹⁻³⁾ Eugenol은 광화학 반응에 관여하고, 항산화작용, 살충제 역할, 광세포 독성이 있는 것으로 보고되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 일반적으로 eugenol은 낮은 농도에서는 항산화제, 항염제로의 작용이 있고, 반면에 높은 농도에서는 조직손상 자유라디칼의 생성을 증가시키는 최산화제(prooxidant)로 작용한다고 알려져 있다.^{7,8)} Eugenol은 효소 또는 비효소적 방법으로 단일 전자 경로(one-electron pathway)를 통하여 phenoxyl radical로 산화되고 이어서 세포독성을 포함한 eugenol quinonemethide로 전환된다.⁹⁻¹¹⁾ 그러나 eugenol의 세포독성과 연관 있는 상세한 기전은 아직 잘 이해되고 있지 않다.

계획 세포사로 알려진 세포자멸사는 세포수축, 염색질 응축, 형질막 수포, DNA 분절, 최종적으로는 더 작은 조각으로 분해되는 형태학적 특징을 보인다.¹²⁾ 이러한 세포자멸사에는 미토콘드리아 투과성 전이(mitochondrial permeability transition, MPT)의 대표적인 예인 미토콘드리아 막전압의 저하, 그로 인한 미토콘드리아의 시토크롬 *c* 방출을 유발, 결과적으로 caspase 연속단계를 활성화시켜 DNA를 절단하므로 세포자멸사를 유도한다.¹³⁾

VP-16, cisplatin, adriamycin, paclitaxel 등 항암 화학요법에 쓰이는 다양한 화합물이 세포자멸사를 유도한다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 이 중 세포자멸사 유도 효과가 강력하면서 최소한의 독성을 가진 화합물이 항암 약물로서 효용가치를 가질 것이다. 그러한 약제를 알아내기 위한 시도의 하나로 본 실험에서는 암세포에 대한 eugenol의 효과와 HL-60 세포주에서 세포자멸사 유도효과를 연구하였다.

대상 및 방법

1. 시료

HL-60 (human promyelocytic leukemia), U-937 (human histiocytic lymphoma), HepG2 (human hepatoma), 3LL Lewis (mouse lung carcinoma), SNU-C5 (human

colon cancer) 세포주들은 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였다. Eugenol과 Methyleugenol은 Tokyo Chemical Industry Co. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. RPMI 1640 배지, fetal bovine serum (FBS), 페니실린과 스트렙토마이신은 Life Technologies Inc. (Gland Island, NY, USA)로부터 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT), RNase, leupeptin, aprotinin, phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF), 4,6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI), reduced glutathione (GSH), 2-vinyl pyridine, N-acetylcysteine (NAC), 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)와 oxidized glutathione (GSSG)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)의 것을 사용하였다. β -actin, bcl-2, bax, 시토크롬 *c* (cytochrome *c*), caspase-3와 caspase-9의 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)의 것을 사용하였고, 로다민 123 (Rhodamin 123)은 Molecular Probes Inc. (Eugene, Oregon, USA)에서 구입하였다.

2. 세포배양

10% FBS, 100units/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 함유한 RPMI 1640배지에 현탁시킨 뒤 5% CO₂를 함유하며 37°C를 유지하는 배양기에서 배양하였다.

3. MTT 분석

세포독성은 MTT 분석을 통하여 측정되었다. MTT 분석은 Plumb 등이 1989년에 방법에 의하여 행하여졌다.¹⁷⁾ 이를 간략하게 설명하자면 10% FBS를 더한 100 μ L의 RPMI 1640배지에 함유된 각각의 세포(5×10^4)를 96-well plate에 이식하고, 24시간 배양 후 배지에 희석시킨 eugenol을 다양한 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이를 후에 50 μ L의 MTT 용액(5mg/mL stock solution, Sigma)을 첨가하였고 4시간 더 배양하였다. 상등액을 제거하고 DMSO 100 μ L에 녹인 뒤 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 분절 DNA의 정량

Eugenol로 처리한 HL-60 세포주의 DNA는 이미 발표된 방법에 따라 1.5% 아가로스젤에서 전기영동을 시행하였다.¹⁸⁾ 이 젤을 ethidium bromide (0.5 μ g/mL)로 염색하여 UV 하에서 분절 DNA를 확인하였다. DNA 분절은 이미 보고된 방법에 의하여 정량하였다.¹⁹⁾ 세포들을 Apo Buffer 2mL (5mM Tris-HCl (pH 7.4), 1

mM EDTA, 0.5% Triton X-100)으로 잘 현탁하여 얼음에 20분간 방치하였다. 용해질과 상등액은 $27,000\times g$, 20분간 원심분리 후 상등액은 따로 분리하고 침전물에는 2mL의 Apo buffer를 넣어 40초간 초음파로 처리(sonification)하였다. 각 분획의 DNA층에서 각각의 용액 1mL에 $10\mu g/mL$ DAPI $10\mu L$ 를 넣고, Ex.360, Em450에서 형광을 측정하였다. 분절 DNA의 정량은 용해질의 DNA 양과 상등액의 DNA 양의 비율로서 계산하였다.

5. 세포질과 미토콘드리아의 분획추출과 웨스턴 블롯팅

Eugenol과 함께 배양한 HL-60 세포(2.5×10^7)를 $4^{\circ}C$ 에서 $200\times g$, 10분간 원심분리하여 모았다. 이 세포를 ice-cold PBS (phosphate-buffered saline), pH 7.2로 두 번 세척한 후 다시 5분간 $200\times g$ 에서 원심분리하였다. 세포들의 침전물은 ice-cold cell extraction buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 10mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM dithiothreitol, $100\mu M$ PMSF, protease inhibitor cock tail)으로 얼음에서 30분간 다시 현탁시켰다. 세포를 glass dounce와 B-type pestle (80 strokes)를 이용하여 균질화하였고, 균질화된 세포들은 $4^{\circ}C$ 에서 $15,000\times g$, 15분간 원심분리하여 상등액(세포질 부분)은 침전물을 피하도록 조심하면서 제거하였다. 결과적으로 남은 침전물(미토콘드리아 부분)을 다시 extraction buffer로 현탁하였다. 약 $40\mu g$ 의 세포질 단백질을 15% SDS-polyacrylamide gel로 분리하였고, nitrocellulose로 이전하였다. 이 얼룩들을 monoclonal β -actin, bcl-2, bax, anti-cytochrome c, polyclonal anti-caspase-3와 anti-caspase-9 항체들과 함께 반응시킨 후 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) 방법(Amersham Pharmacia Biotech, UK)으로 확인하고 촬영하였다.

6. 미토콘드리아 막전압의 측정

미토콘드리아 막전압의 변화는 세포를 propidium iodide (PI)와 로다민 123으로 이중염색하여 세포를 유세포 측정기로 분석하였다. 즉 HL-60 세포들을 eugenol ($40\mu M$)에 두시간 동안 노출시킨 후 $5g/mL$ 로다민 123이 함유된 배지에 1시간 동안 배양하였다. 세포들은 $5g$ PI가 함유된 1mL의 배지에 다시 현탁하였다. PI와 로다민 123부터의 형광의 세기는 유세포 측정기로 측정하였다. 형광은 $37^{\circ}C$ 에서 30분간 염색한 후 측정하였다.

7. 반응 산소 물질의 측정

Eugenol에 의한 반응 산소 물질을 측정하기 위하여 2,7-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 사용하였다. DCFH-DA는 H_2O_2 에 의해 형광을 나타내는 2,7-Dichlorofluorescein (DCF)로 산화된다. 세포를 0.2% FBS가 들어간 RPMI 1640배지에서 eugenol을 처리하고 원하는 시간만큼 배양한 이후 $20\mu M$ DCFH-DA를 첨가하여 $37^{\circ}C$ 에서 30분간 배양하였다. 세포는 DCFH-DA를 흡수하고, DCFH-DA는 deacetylation되어 non-fluorescent DCFH의 형성과정을 통해 결국 산화되어 DCF가 된다. 형광을 나타내는 세포들은 유세포 측정기로 측정하였다.

8. 세포 내 GSH의 정량

GSH는 이미 발표된 방법을 이용하여 효소 방법으로 측정하였다.²⁰⁾ 세포를 PBS로 두 번 세척하고 세포 내 GSH를 추출하기 위해 5% trichloroacetic acid (TCA)로 처리하였다. 혼합물은 $13,000\times g$ 에서 1분간 원심 분리하여 변성 단백을 제거하였다. $100\mu L$ 의 TCA 추출물을 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.5), 5mM EDTA, 0.6mM DTNB, 0.2mM NADPH, 1unit/mL glutathione reductase가 함유된 반응 화합물 1mL에서 반응시키고 나서 412nm에서 2분간 흡광도를 측정하였다. GSSG (Oxidized glutathione)을 측정하기 위하여 2-vinylpyridine를 사용하여 상기와 같은 방법으로 환원된 GSH를 제거하였다. $2\mu L$ 의 2-vinylpyridine과 $6\mu L$ 의 triethanolamine를 동시에 $100\mu L$ 의 TCA 추출물과 혼합하고 반복 분석을 시작 전에 1시간 동안 상온, 암실에서 배양하였다. 반응 속도는 10분간 monitor 하였다. 412nm에서 흡광도의 증가량을 알려진 GSH 양의 표준곡선을 이용하여 GSH 농도로 전환하여 계산하였다.

9. 세포 내 protein thiols의 측정

세포를 PBS로 두 번 세척하고 5% TCA로 처리하였다. 시료를 소용돌이 혼합기를 이용하여 혼합하여 단백질을 침전시켰다. 30분간 얼음에 보관하여 원심분리 후에 단백질 침전물을 같은 TCA로 세척하고 난 다음 5mM EDTA와 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함된 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 다시 녹였다. 단백질 침전물의 일정부분($100\mu L$)은 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.5), $5\mu M$ EDTA, 0.6mM DTNB, 0.2mM NADPH, 1unit/ml glutathione reductase가 함유된 용액과 반응시키고, 다른 일정부분($100\mu L$)은 반응

Table 1. Cytotoxic activity of eugenol and methyleugenol on cancer cell growth

Cell line	IC50* (μ M)		
	Eugenol	Methyleugenol	Cisplatin
U-937	39.4	89.3	22.0
HL-60	23.7	76.5	17.7
HepG2	118.6	275.9	54.6
3LL Lewis	89.4	>300	36.5
SNU-C5	129.4	>300	27.4

*IC50 is defined as the concentration which results in a 50% decrease in cell number as compared with that of the control in the absence of an inhibitor. The values represent the mean of three independent experiments.

시킴기 전에 5mM의 NEM (N-ethylmaleimide)로 처리하여 대조군으로 사용하였다.

결 과

1. 암세포에 대한 eugenol의 성장 억제 효과

HL-60 (human promyelocytic leukemia), U-937 (human histiocytic lymphoma), HepG2 (human hepatoma), 3LL Lewis (mouse lung carcinoma), SNU-C5 (human colon cancer) 세포주들에 대한 eugenol과 methyleugenol의 세포독성을 MTT 분석을 통해 측정하였다. Eugenol의 생물학적인 효과에서 p-OH 기능을 알기 위하여 methyleugenol을 이용하여 실험하였다. Eugenol은 암세포에 따라 23.7 μ M에서 129.4 μ M까지의 IC₅₀ 값을 보여 주었다(Table 1). 반면에 methyleugenol의 세포독성은 이보다 약한 값을 보여주었다. Eugenol은 HL-60세포에서 가장 높은 세포독성을 나타내었다.

2. Eugenol에 의한 세포자멸사 유도

DNA 분절들이 유도되는 것을 다양한 시간과 eugenol의 농도로 세포를 배양한 후 확인하였다(Fig. 1A). DAPI를 이용하여 유세포 분석 방법에 의하여 정량화된 DNA 단편의 양은 시간 및 농도에 비례하여 증가하였다. 4시간 동안 40 μ M eugenol로 세포들을 처리 했을 때 DNA 분절들은 "ladder" 현상으로 불리는 사다리 모양의 작은 조각들로 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 그러나 DNA 분절은 항산화제 N-acetylcystein (NAC)의 전 처리에 의해 완전히 차단된다. 이러한 결과는 eugenol이 반응 산소 물질을 생산함으로써 세포자멸사를 유도한

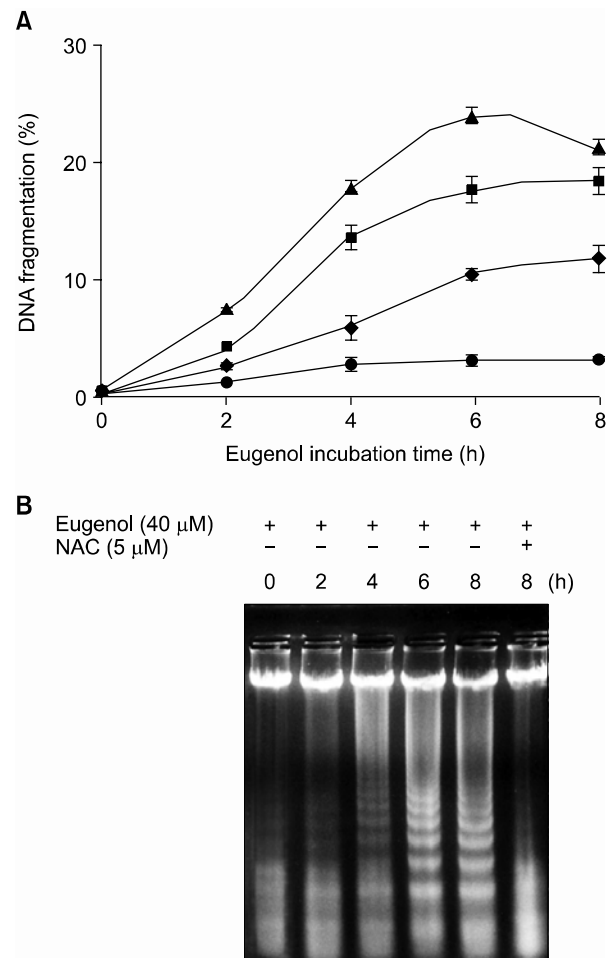


Fig. 1. Effects of eugenol on the induction of apoptosis and DNA fragmentation in HL-60 cells. (A) HL-60 cells were treated with increasing concentrations of eugenol for the indicated times. The extent (%) of fragmentation was determined using DAPI as described in Materials and Methods. Data presented are the means \pm SD of results from three independent experiments. \blacklozenge , 20 μ M eugenol; \blacksquare , 40 μ M eugenol; \blacktriangle , 60 μ M eugenol; \bullet , 40 μ M eugenol in the pre-treatment of 5mM NAC. (B) HL-60 cells were treated with 40 μ M eugenol for the indicated time period in the presence or absence of 5mM NAC and DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis.

다는 것을 의미한다.

3. Eugenol에 의한 시토크롬 c의 방출 및 caspase family의 활성화 유도

HL-60 세포에서 40 μ M eugenol로 2시간 처리 시 시토크롬 c가 세포질 내로 방출되고, 세포질에서 미토콘드리아로 bax 전위가 일어남을 확인하였다. 나아가 40 μ M eugenol 처리 시 시간에 따라서 procaspase-3와

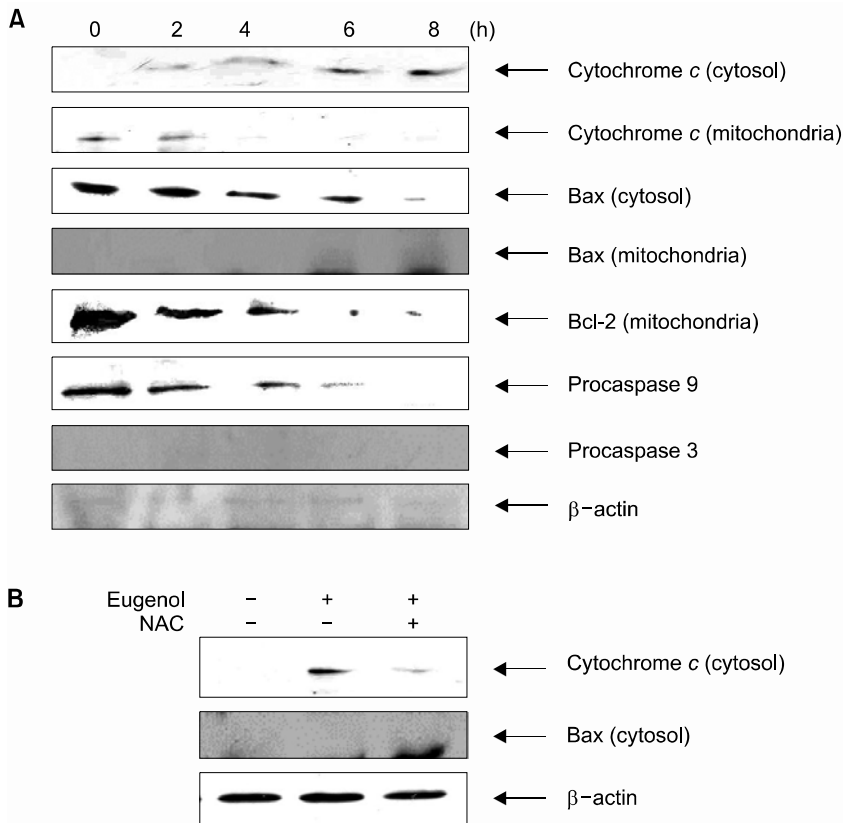


Fig. 2. (A) Eugenol caused the cleavage of procaspase-9 and -3, the releasing of cytochrome c from mitochondria, accumulation of cytochrome c in cytosol, translocation of bax to mitochondria and inhibition of Bcl-2 in mitochondria. HL-60 cells were treated with eugenol (40 μ M) for indicated time points. After treatment, the cytosolic and mitochondrial fractions were separated by SDS-PAGE, transferred onto cellulose membranes, and then blotted with specific antibodies for cytochrome c, bax, bcl-2, caspase-9 and caspase-3 and specific antibodies. The amount of β -actin was measured as an internal control. (B) Eugenol caused the accumulation of cytochrome c and translocation of bax to mitochondria. HL-60 cells were cultured in the presence or absence of 5mM NAC for 1h and then 40 μ M eugenol was added and incubated for 8h.

procaspase-9가 분활됨을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 eugenol에 의한 세포사 유도가 반응 산소 물질의 생성과 관련 있는지 확인하기 위하여 항산화제인 N-acetylcystein (NAC)을 전 처리한 결과 세포질 내로 시토크롬 c 방출과 미토콘드리아로 bax 전위가 감소됨을 보였다. 이와 같은 결과들은 eugenol 유도 세포자멸사에서 미토콘드리아 의존적인 bax-시토크롬 c-procaspase-9 경로가 반응 산소 물질에 의해 유도됨을 시사한다.

4. Eugenol 처리 후 미토콘드리아 막전압의 변화

Eugenol로 처리한 미토콘드리아 막전압의 변화를 로다민 123과 PI로 이중염색 후에 유세포 측정기로 측정하였다(Fig. 3). 양이온 색소 로다민 123은 미토콘드리아에 의해서 선택적으로 미토콘드리아 막전압에 비례하여 염색된다. HL-60 세포의 유세포 측정기는 로다민 123 염색에서 높은 형광을 보였고 PI 염색에서 낮은 형광을 보였다(Fig. 3A). 반면에 eugenol로 처리한 HL-60 세포는 로다민 123 염색에서 낮은 형광을 보였고 PI 염색에서도 낮은 형광을 보였다(Fig. 3B). 이 특정한 부분의 분포는 미토콘드리아 막전압이 변화된 세포들의 분포를 의미한다. 한편 반응 산소 물질과 미토

콘드리아 막전압의 관계 및 항산화제가 eugenol 유도 미토콘드리아 막투과도에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 대표적인 항산화제인 NAC와 eugenol을 함께 처리하여 미토콘드리아 막전압에 대한 eugenol의 효과를 완전히 저해하였고 로다민 123 염색에서 높은 형광이고 PI 염색에서 저형광인 부분이 계속 유지됨을 보았다(Fig. 3D). 이것은 NAC로만 처리한 대조 세포군에서의 분포에서는 효과가 없음을 보여주고 있다(Fig. 3C). 로다민 123과 PI 염색에서 형광염색이 되지 않는 세포의 백분율은 Fig. 3A, B, C, D에서 보인 대로 각각 2.44%, 14.79%, 2.40%, 2.57%였다.

5. Eugenol의 반응 산소 물질(reactive oxygen species) 유도

Fig. 4A와 4B에서 보이는 대로 HL-60 세포에서 DCF에 반응한 반응 산소 물질은 보이지 않았다. 하지만 40 μ M eugenol의 처리시 1시간 전후로 급격하게 반응 산소 물질 생성이 증가하는 양상을 보였다. 그리고 eugenol에 의한 반응 산소 물질의 생성이 NAC에 의해 급격하게 줄어듦을 확인하였다(Fig. 4A, B). 5mM의 NAC 처리는 DNA 분절(Fig. 1B)을 효과적으로 저해하였고,

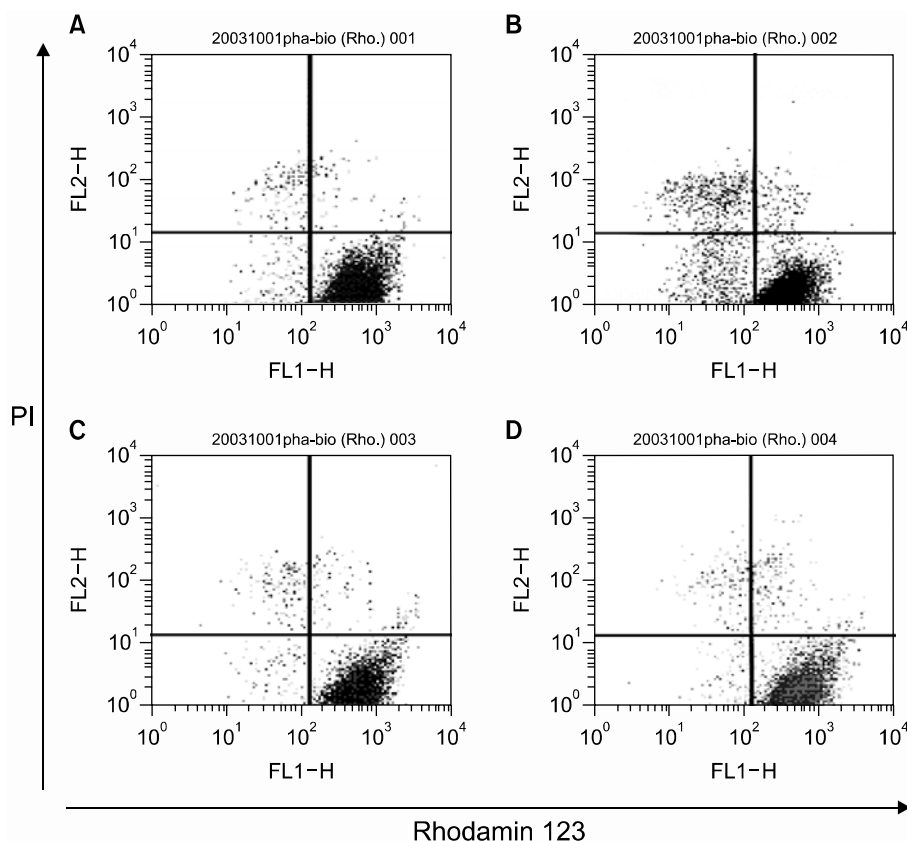


Fig. 3. Determination of mitochondrial membrane potentials ($\Delta\Psi_m$). HL-60 cells were treated with 40 μ M eugenol in the absence or presence of 5mM NAC for 1h and then $\Delta\Psi_m$ were determined using rhodamin 123 and PI by flow cytometry as described in Materials and Methods. Data are representative of three independent experiments. (A) control, (B) 40 μ M eugenol for 2 h, (C) 5mM NAC for 1h, (D) 5mM NAC for 1h and then 40 μ M eugenol was added for 2h.

시토크롬 *c* 방출(Fig. 2B)과 미토콘드리아 막전압의 상실(Fig. 3)을 억제하였다.

6. Eugenol 처리 후 HL-60 세포 내 GSH의 고갈

세포 내 환원형 GSH의 양을 효소적 방법으로 측정하였고 또한 PSH (protein thiol)양도 정량하였다. Fig. 5는 eugenol 20, 40, 60 μ M 처리에 의해 15분부터 시간 및 농도 의존적으로 세포 내 GSH가 급격히 감소하는 현상이 관찰되었으며 GSH 외에 세포 내 중요한 산화 환원 인자인 PSH를 측정한 결과, 시간 및 농도에 따라 유의성 있는 감소가 관찰되었다(Fig. 5A, B). 따라서 세포 내 thiols의 급격한 감소에 의한 반응 산소 물질의 생성이 eugenol에 의한 세포자멸사에 있어 중요한 역할을 함을 시사한다.

고찰

본 연구는 eugenol이 사람 전골수구백혈병 세포주인 HL-60 세포에서 세포자멸사를 유도함을 관찰하였다. Eugenol의 이러한 세포자멸사의 유도는 DNA 분절 분석과 아가로스젤 전기영동법에 의한 DNA 분절로 확

인하였다(Fig. 1).

세포자멸사의 과정은 세포질로부터 미토콘드리아로 bax 전위가 일어나 미토콘드리아로부터 시토크롬 *c*가 방출이 일어나는 것으로 알려져 있다. 시토크롬 *c*는 미토콘드리아에서 방출되어 procaspase-9, Apaf-1과 복합체를 이루어 caspase-9를 활성화 시키고, 이것이 다시 효과 caspase인 caspase-3을 활성화시킨다.²¹⁾ 반대로 bcl-2는 시토크롬 *c*의 방출을 막는다. 본 실험에서도 이러한 결과와 부합되게 eugenol이 세포질에서 미토콘드리아로의 bax 전위와 bcl-2 단백질의 감소와 미토콘드리아 막전압의 변화와 동반된 세포질 내로 시토크롬 *c*의 방출이 일어나며, 이에 따른 caspase-9과 caspase-3의 활성화를 보였다.

항산화제인 N-acetylcystein (NAC)의 전처리는 eugenol 유도 시토크롬 *c*와 bax 의존 경로 세포자멸사를 억제하였다(Fig. 2B). 이것은 HL-60 세포의 세포자멸사가 반응 산소 물질 생성과 관련되어 eugenol에 의하고 있음을 시사한다. 이와 함께 본 결과는 bax 전위에 의한 미토콘드리아로부터 시토크롬 *c* 방출을 나타내는 caspase-9과 caspase-3사이의 일련의 관련성이 있음을 의미한다. 시토크롬 *c*의 방출은 미토콘드리아 투과

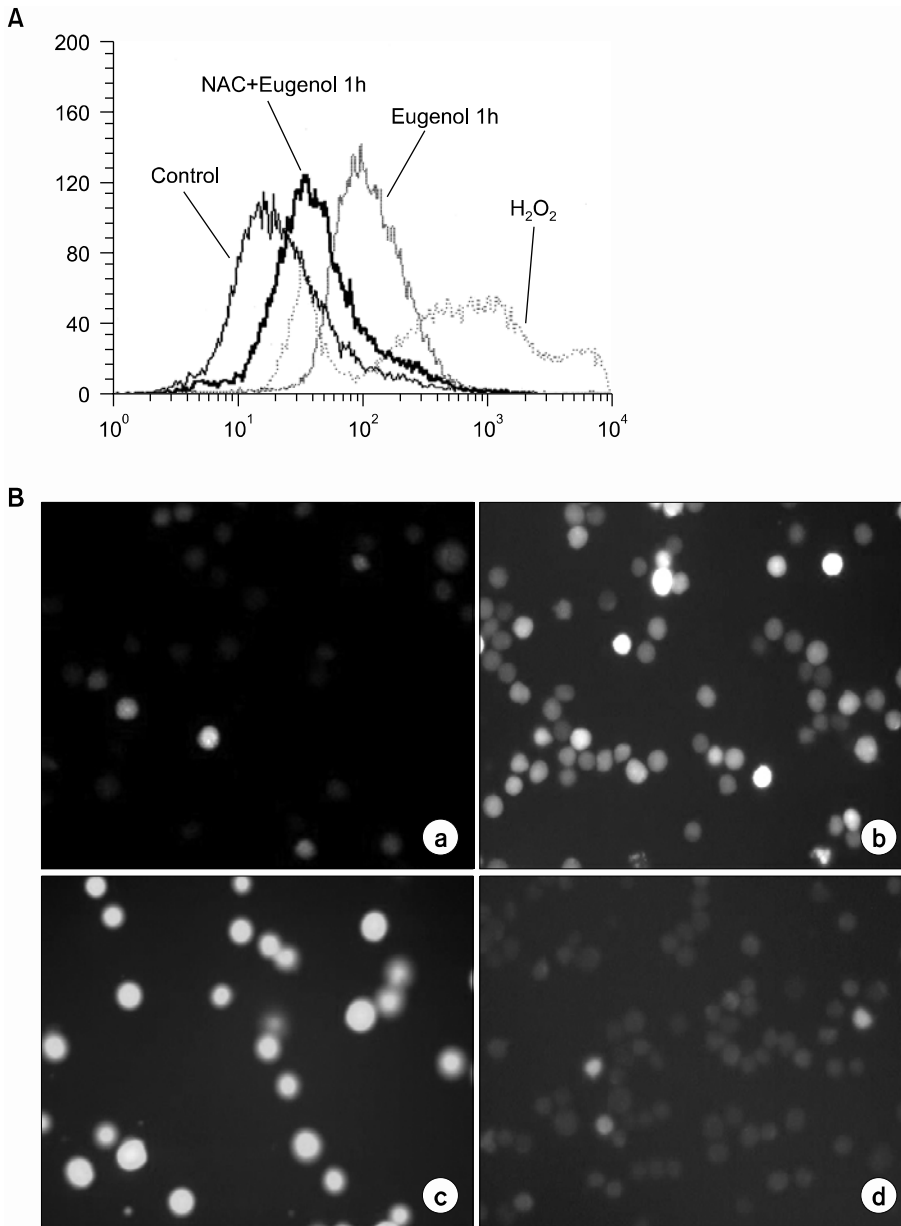


Fig. 4. Eugenol induces the generation of ROS. HL-60 cells were cultured in the presence or absence of 5mM NAC for 1h and then 40M eugenol was added and incubated for 2h. DCF fluorescence was detected by (A) flow cytometry and (B) fluorescent microscope ($\times 200$) after 1h of eugenol treatment. Data are representative of three independent experiments. (a) control (b) 40 μ M eugenol for 30min (c) 40 μ M eugenol for 1h (d) 5mM NAC for 1h and then 40 μ M eugenol was added for 30min.

성 전이 개방으로부터의 결과인 미토콘드리아 막전압의 저하와 관련 있음은 이미 보고되어 있다.²²⁾

반응 산소 물질과 같은 자극은 종종 미토콘드리아 막전압의 상실을 일으키는 것으로 알려져 왔다. 특히 미토콘드리아의 경우 그 전압을 상실하게 되면 내부에 있던 시토크롬 *c* 등이 외부로 나오는데 이런 시토크롬 *c*는 세포자멸사 유도에 중요한 유도 물질이다. 반응 산소 물질은 세포자멸사를 유도하는 초기 신호임이 밝혀지고 있다.^{23,24)} Eugenol이 실제로 세포 내에서 반응 산소 물질을 생성하는지를 살펴보기 위하여 2,7-dichlorofluorescein (DCF)와 형광현미경을 이용하여 반응

산소 물질을 측정하였다(Fig. 4). 이 경우 DCFH와 상호 작용하는 반응 산소 물질은 superoxide radical보다 hydrogen peroxide에 더 민감하다.^{25,26)} 또한 NAC 전처리된 HL-60 세포들은 eugenol에 의한 막전압의 소실과 DNA 분절을 억제하였다. 이러한 결과들은 반응 산소 물질이 eugenol에 의한 세포자멸사에 중요한 역할을 하고 있음을 제시하고 있다.

세포자멸사를 제시하는 여러 기전 중에서 가장 주목해야 할 것은 세포 내의 산화-환원 환경이다. 최근 산화-환원 환경의 주요 요소인 세포 내 GSH가 여러 물질에 의해 유도된 세포자멸사의 시작 전에 고갈된다는 것

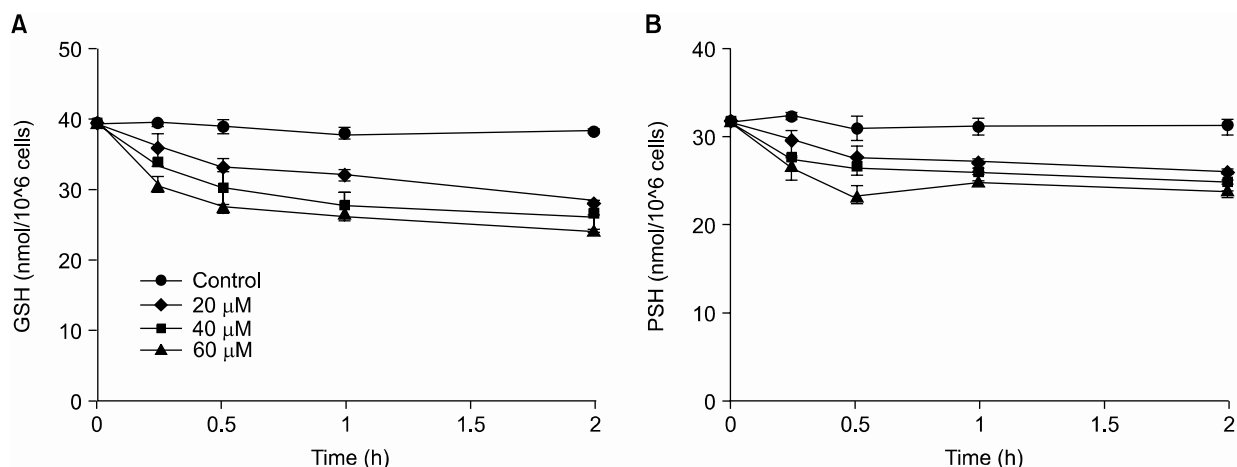


Fig. 5. Effects of eugenol on the level of intracellular GSH and protein thiols. Cells were treated with various concentrations of eugenol for the indicated period and then the level of intracellular GSH (A) and protein thiols (B) were determined. ●, control; ◆, 20 μ M; ■, 40 μ M; ▲, 60 μ M. Data are presented as mean \pm S.D. of results from three independent experiment.

이 밝혀졌다.²⁷⁻²⁹⁾ 이러한 GSH가 어떤 외부 자극에 의하여 증가 또는 감소될 경우 세포 내에서는 다양한 현상이 발생하게 된다. 예를 들어 GSH가 짧은 순간에 감소될 경우 세포 내에서 산화-환원 평형의 상실로 반응 산소 물질 같은 물질들이 증가하게 되고 이들이 세포 내 여러 경로를 통해 다양한 영향을 주게 된다. 더욱이 GSH 고갈 세포는 세포자멸사 물질에 보다 민감하게 반응한다.^{30,31)} 본 결과들은 eugenol로 인한 세포 내 thiols의 고갈(Fig. 5)이 산화-환원 환경의 불균형을 만들고 그 결과 미토콘드리아 투과 전이성 증가, 세포질 내로의 시토크롬 *c* 방출, caspase-9의 활성을 통한 caspase-3의 활성화와 DNA 분절을 야기하는 반응 산소 물질이 생겨난다는 것을 시사한다.

사람 암 세포에서 세포자멸사를 유도하는 화합물이 암세포의 세포자멸사를 일으켜 항암 효과를 유도할 수 있는 항암제로서 또한 화학적 예방제로서의 잠재적 유용성 때문에 많은 연구가 이루어지고 있다.³²⁾ 본 실험에서 우리는 eugenol이 사람의 급성전골수백혈병 세포주 HL-60의 세포자멸사를 유도함을 관찰하였다. 향후 eugenol이 단독 혹은 다른 항암제와 병합하여 항암 화학요법제로써 사용이 가능할지를 연구할 필요가 있을 것으로 생각한다.

요 약

배경: Eugenol은 정향나무(*Eugenia caryophyllata*)로부터 분리된 정유의 주요 성분이며 주로 치과용 국소 마취, 진통제로 전통적으로 사용된다. 본 연구는 전골수

구백혈병 세포주(human promyelocytic leukemia cells, HL-60)에서의 eugenol의 세포 독성 효과, apoptosis의 유도과 apoptosis에 관련되는 경로를 조사하였다.

방법: HL-60 세포에 eugenol을 처리하여 propidium과 rhodamin 123 이중염색과 2',7'-dichlorofluorescein diacetate를 이용하여 반응 산소 물질(reactive oxygen species, ROS)과 미토콘드리아 막전압(mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$)을 평가하였다.

결과: Eugenol은 apoptosis의 강력한 유도물질이고 반응 산소 물질의 생성을 통해 apoptosis 신호를 전달시켜 미토콘드리아 투과성 전이(mitochondrial permeability transition, MPT)와 세포질 내로의 cytochrome *c*의 방출을 유도하였다. 반응 산소 물질의 생성, 미토콘드리아의 변화, 그에 따른 eugenol로 처리한 세포에서의 apoptotic cell death는 항산화제인 N-acetylcysteine (NAC)에 의해서 차단되었다.

결론: 저자들은 본 연구에서 eugenol이 미토콘드리아 투과성 전이를 매개로 한 반응 산소 물질과 cytochrome *c* 방출을 유도함을 확인하였다.

참 고 문 헌

- 1) Harborne JB, Baxter H. Phytochemical dictionary, Washington DC: Taylor and Francis, 1993:1765.
- 2) Zheng GQ, Kenney PM, Lam LK. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*). J Nat Prod 1992; 55:999-1003.
- 3) Miyazawa M, Hisama M. Suppression of chemical mutagen-induced SOS response by alkylphenols

- from clove (*Syzygium aromaticum*) in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 umu test. *J Agric Food Chem* 2001;49:4019-25.
- 4) Ogata M, Hoshi M, Urano S, Endo T. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem Pharm Bull* 2000;48:1467-9.
 - 5) Park IK, Lee HS, Lee SG, Park JD, Ahn YJ. Insecticidal and fumigant activities of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials against *Mechoris ursulus* (Coleoptera: Attelabidae). *J Agric Food Chem* 2000; 48:2528-31.
 - 6) Atsumi T, Iwakura I, Fujisawa S, Ueha T. Reactive oxygen species generation and photo-cytotoxicity of eugenol in solutions of various pH. *Biomaterials* 2001; 22:1459-66.
 - 7) Chogo JB, Crank G. Chemical composition and biological activity of the Tanzanian Plant *Ocimum suave*. *J Nat Prod* 1981;42:308-11.
 - 8) Asha MK, Prashanth D, Murali B, Padmaja R, Amit A. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. *Fitoterapia* 2001;72:669-70.
 - 9) Wright SE, Baron DA, Heffner JE. Intravenous eugenol causes hemorrhagic lung edema in rats: proposed oxidant mechanisms. *J Lab Clin Med* 1995; 125:257-64.
 - 10) Suzuki Y, Sugiyama K, Furata H. Eugenol-mediated superoxide generation and cytotoxicity in guinea pig neutrophils. *Jpn J Pharmacol* 1985;39:381-6.
 - 11) McDonald JW, Hoffner JE. Eugenol causes oxidant-mediated edema in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:806-9.
 - 12) Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:337-43.
 - 13) Petit PX, Lecoecur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 1995;130: 157-67.
 - 14) Kaufmann SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 1989; 49:5870-8.
 - 15) Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996;2:574-7.
 - 16) Bhalla K, Ibrado AM, Tourkina E, et al. High-dose mitoxantrone induces programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Blood* 1993;15:3133-40.
 - 17) Plumb JA, Milroy R, Kaye SB. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res* 1989;49:4435-40.
 - 18) Lee KT, Kim JI, Rho YS, et al. Hypericin induces both differentiation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biol Pharm Bull* 1999; 22:1271-4.
 - 19) Watabe M, Kawazoe N, Masuda Y, Nakajo S, Nakaya K. Bcl-2 protein inhibits bufalin-induced apoptosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation in human leukemia U937 cells. *Cancer Res* 1997;57:3097-100.
 - 20) Neumann C, Boubakari, Grunert R, Bednarski PJ. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-regenerating system coupled to a glutathione-reductase microtitier method for determination of total glutathione concentration in adherent growing cancer cell lines. *Anal Biochem* 2003;320:170-8.
 - 21) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;14:479-89.
 - 22) Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol* 1998;18:6353-64.
 - 23) Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000;5:415-8.
 - 24) Catisti R, Vercesi AE. The participation of pyridine nucleotides redox state and reactive oxygen in the fatty acid-induced permeability transition in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 1999;464:97-101.
 - 25) Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 1998;273:26900-7.
 - 26) Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1998;273:11619-24.
 - 27) Ghibelli L, Fanelli C, Rotilio G, et al. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J* 1998;12:479-86.
 - 28) Macho A, Hirsch T, Marzo I, et al. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J Immunol* 1997;158: 4612-9.

- 29) Beaver JP, Waring P. A decrease in intracellular glutathione concentration precedes the onset of apoptosis in murine thymocytes. *Eur J Cell Biol* 1995; 68:47-54.
 - 30) van den Dobbelaen DJ, Nobel CS, Schlegel J, Cotgreave IA, Orrenius S, Slater AF. Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J Biol Chem* 1996; 271:15420-7.
 - 31) Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* 1999;93: 268-77.
 - 32) Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 1997;278:1073-7.
-